

[First Hit](#)[Previous Doc](#)[Next Doc](#)[Go to Doc#](#)

Generate Collection

Print

L3: Entry 12 of 15

File: DWPI

Jan 30, 2002

DERWENT-ACC-NO: 2002-292920

DERWENT-WEEK: 200234

COPYRIGHT 2006 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Crops capable of resisting virus diseases of poultry and production method thereof

INVENTOR: QIN, Z ; ZHONG, A

PATENT-ASSIGNEE:

ASSIGNEE

SHENZHEN SANFANGYUAN INFORMATION TECHNOL

CODE

SHENN

PRIORITY-DATA: 2001CN-0125352 (August 16, 2001)

Search Selected

Search ALL

Clear

PATENT-FAMILY:

PUB-NO

PUB-DATE

LANGUAGE

PAGES

MAIN-IPC

☐ CN 1333370 A

January 30, 2002

000

C12N015/63

APPLICATION-DATA:

PUB-NO

APPL-DATE

APPL-NO

DESCRIPTOR

CN 1333370A

August 16, 2001

2001CN-0125352

INT-CL (IPC): A01H 1/00; A01H 1/06; C12N 15/21; C12N 15/33; C12N 15/63; C12N 15/74; C12N 15/87

ABSTRACTED-PUB-NO: CN 1333370A

BASIC-ABSTRACT:

NOVELTY - The present invention discloses a crop capable of resisting one kind, two kinds of three kinds of fowl viruses of avian influenza, Newcastle disease and infective cloacal bursa disease and its production method. It is characterized by that the active antigen protein in the crop is obtained by virus RNA inverse transcription, and can encode complete DNA sequence of correspondent HA and VP2 protein, and is summation of three-dimensional structure formed in root, stem, leaf and seed of the crop. Said invented production method includes the following processes: insertion of HA, F and VP2 hologene into plasmid vector, expression of recombinant plasmid transferred into plant, pairwise hybridization of plants which respectively possess the action of resisting the above-mentioned three viruses or simultaneous hybridization of three plants, planting the different transgenic seeds into soil to obtain crops which can be used as raw material of feed and feeding fowl with feed containing recombinant active protein.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

TITLE-TERMS: CROP CAPABLE RESISTANCE VIRUS DISEASE POULTRY PRODUCE METHOD

DERWENT-CLASS: B04 C06 D16 P13

CPI-CODES: B04-A09A; B04-A09B; B04-A09D; B04-A09F; B04-F11; C04-A09A; C04-A09B;  
C04-A09D; C04-A09F; C04-F11; D05-H09;

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C2002-086157

Non-CPI Secondary Accession Numbers: N2002-228667

[Previous Doc](#)

[Next Doc](#)

[Go to Doc#](#)

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01125352.5

C12N 15/63  
C12N 15/33 C12N 15/74  
C12N 15/21 C12N 15/87  
A01H 1/00 A01H 1/06

[43] 公开日 2002 年 1 月 30 日

[11] 公开号 CN 1333370A

[22] 申请日 2001.8.16 [21] 申请号 01125352.5  
[71] 申请人 深圳市三方圆信息技术有限公司  
地址 518048 广东省深圳市新洲南路金地海景花园 16 栋 401 室  
[72] 发明人 钟安清 秦智锋

[74] 专利代理机构 深圳市专利服务中心  
代理人 王雄杰

权利要求书 6 页 说明书 15 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 抗家禽病毒病的作物及其生产方法

[57] 摘要

本发明公开了一种抗禽流感、新城疫和传染性法氏囊病三种家禽病毒病中的一种、二种或三种的作物及生产方法,作物中的活性抗原蛋白是由病毒 RNA 反转录获得并可编码相应 HA、F 和 VP2 蛋白的全 DNA 序列,为作物的根、茎、叶和种子中形成的立体结构的总和,通过将 HA、F 和 VP2 全基因插入质粒载体、重组质粒转入植物中表达、对三种病毒分别具有抵抗作用的植株两两杂交或者三个植株同时杂交,不同转基因种子种入土壤获得可作为饲料原料的作物及将含重组活性蛋白的饲料饲喂家禽等过程,有效地解决了免疫用饲料粮食的生产和家禽三种疾病的免疫问题,具有生产简单、免疫操作方便和对家禽保护力强等优点,广泛适用于各类家禽的饲养免疫。

ISSN 1008-4274

知识产权出版社出版

01.08.21

## 权 利 要 求 书

---

1、一种抗家禽禽流感、新城疫和传染性法氏囊病三种病毒病中的一种、二种或三种疾病的作物，包括玉米、水稻、小麦、大豆和油菜等，其特征在于：它们完整地表达了禽流感病毒，新城疫病毒和传染性法氏囊病毒中的任意一种、二种或三种病毒的抗原并可使家禽产生有效免疫力，用以表达的免疫原性蛋白基因为：

(1) 禽流感病毒的主要免疫原性蛋白基因即 HA 基因：

```
ttgaattcttgaattcatggaaagaacagtgcttcttcttgcaacagtcagtccttgta  
aaagtgatcagatttgcattggttaccatgcaaacaactcgacagagcaggttgacaca  
ataatggaaaagaatgttactgttacacatgccaagacatactggaaaggacacacaa  
cggaagctctgcatctaaatggagtgaagcctctcattttgagggtttagttagt  
ctggatggctcctcgaaaccctatgtgtgacgaattcatcaatgtgccggaatggtct  
tacatagtgaggagaaggccagtcagccaatgacctctgttatccagggaatttcaacga  
ctatgaagaactgaaacacctattgagcagaataaaccattttgagaaaattcagatca  
tccccaaaagttcttggccaatcatgatgcctcatcaggggtgagctcagcatgtcca  
taccttgggaggtcctcctttttcagaaatgtggtatggcttatcaaaaagaacagtcg  
ataccaacaataaagaggagctacaataataccaaccaagaagatcttttggtactgt  
ggggggttcaccatcctaataatgatgcggcagagcagacaaagctctatcaaatccaacc  
acctacatttccgttggaaatcaacactgaaccagagattggttccagaaatagctac  
tagacccaaaagtaaacgggcaaagtggagaatggagttcttctggacaattttaagc
```

01.08.21

cgaatgatgccatcaatttcgagagtaatggaatttcattgctccagaatatgcatac  
aaaattgtcaagaaaggggactcaacaattatgaaaagtgaattggaatatggtaactg  
caacaccaagtgtcaaactccaatgggggcgataaactctagtatgccattccacaaca  
tacacccccctaccatcggggaatgccccaaatatgtgaaatcaaacagattagtcctt  
gcgactggactcagaaataccctcaaagagagagaagaagaaaaagagaggactatt  
tggagctatagcaggttttatagaggaggatggcagggaatggtagatggttggtatg  
ggtaccaccatagcaatgagcaggggagttgctactctgcagacaaagaatccactcaa  
aaggcaatagatggagtcaccaataaggtcaactcgatcattaacaaaatgaacactca  
gtttgaggccgttgaaggggaatttaataacttggaaggagtagagaatttaaacaa  
agaagatggaagacggatttcctagatgtctggacttacaatgctgaacttctggttctc  
atggaaaatgagagaactctcgactttcatgactcaaatgtcaagaacctttacgacaa  
ggtccgactacagcttagggataatgcaaaggagctgggtaatggttggttcgaattct  
atcacaaatgtgataatgaatgtatggaaagtgtaaaaacggaacgtatgactaccg  
cagtattcagaagaagcaagactaaacagagaggaaataagtggagtaaaattggaatc  
aatgggaacttaccaaatactgtcaatttattcaacagtggcgagttccctagcactgg  
caatcatggttagctggtctatctttatggatgtgctccaatggatcgttacaatgcaga  
atttgcatTTAAATTTgtgagttcagattgtagttaaaaacaccctgacgtcgagacgt  
acc

(2) 新城疫病毒的主要免疫原性蛋白基因即 F 基因:

ttgaattcatgggccccaaatcttctaccaatgtcccagcacctctgatgctgaccgtcaggattgcgctg  
gcactgagctgtgtccgtctgacaaattctctgatggaaggcctcttgagctgcagggattgtagtaac  
gggagacaaagcagtcacatatacacctcatctcagacagggtcaataatagtcaggttactcccaaat

01.08.21

atgcctaaggataaagaggcgtgtgcaaaagccccgttggaggcatacaacaggacactgactgctttg  
ctcacccttgggtgattctatccgcaggatacaagagtctgcgactacgtccggaggaaggaggcag  
agacgctttatagggtgccattatcggcagtgtagctcttgggggtgccacagctgccagataacagcag  
cctcagctctgatacaagccaaccagaatgctgccaacatcctccggcttaaagagagcattgctgcaac  
taatgaagctgtacatgaagtcactgacggattatcgcaactagcagtggcagttgggaagatgcagca  
gtttgttaatgaccagtttaataacacagctcaggaattggactgtataaaaattacacagcaggttggtga  
gaactcaacctgtacctaaactgaattgactacagtattcgggccacaaatcacttcccctgccttaactcag  
ctgactatccaggcgctttacaatctagctgggtgtaagatggattattgttgactaagttaggtgttgga  
acaaccaactcagctcattaatcggtagcggcttgatcacggtaaccctattctgtacgattcacagactc  
aactcttaggtatacaggtaaccttaccctcagtcggtaacctaaataatgctgtctacacttgtagac  
ctgtctgtaagcacaaccaagggttgcctcagcactgtccaaaagtggtagacacaggtcgggtct  
gtgatagaggaactgacacctcactgtgttagagaccgatttgatttatattgtacaagaatagtgaca  
ttccctatgtctcctgttatttctgtctgagcggtaatacatcagcttgcatgtattcaagactgaaggt  
gcacttactacgccatatatgactatcaagggtcagttattgccaattgcaagataacaacatgcagatgt  
gcagaccctccgggtatcatatcgcaaaattatggagaagctgtgtctctaatagataggcactcatgcaa  
tgtcttatccttagacgggataactttgaggctcagtggaattgacgtaacttatcaaaagaatatctca  
atattagattctcaggtaatagtgacaggcaatctcaatatctcaactgaacttggaatgtcaacaactcg  
ataagtaatgctttggataagtttagaggaaagcaatagcaaaactgacaaagtcaatgtcaagctgaccg  
gcacgtctgctctcattacctatatagttttaactatcatatcttgtttgtgtatcttagcctggtctagca  
tgctatctgatgtataagcaaaaggcgcaaaaaagaccttatttggttggaataataccctaaatca  
gatgagggccactacaagaatctgaacacagagacgtccc

(3) 法氏囊病毒的主要免疫原性蛋白基因即 VP2 基因:

01.05.21

ttgaattcatgacaaacctgcaagatcaaaccacagattgttccgttcatacggagc  
cttctgatgccacaaccggaccggcgtccattccggacgacaccctggagaagcacac  
tctcaggtcagagacctcgacctacaatttgactgtgggggacacagggtcagggctaa  
ttgcctttttccctggattcccctgggtcaattgtgggtgctcactacacactgcagagc  
aatgggaactacaagttcgatcagatgctcctgactgccagaacctaccggccagcta  
caactactgcaggctagtgagccggagtctcacagtaaggtcaagcacactccctggtg  
gcgtttatgcactaaacggcaccataaacgccgtgaccttccaaggaagcctgagtga  
ctgacagatgttagctacaatggattgatgtctgcaacagccaacatcaacgacaaaat  
tggaacgtccttagtaggggaaggggtcacgctcctcagcttaccacatcatatgatc  
ttgggtatgtgagacttggtgacccatacccgctatagggttgacccaaaaatggta  
gcaacatgtgacagcagtgacaggcccagagtctacactataactgcagccgatgatta  
ccaattctcatcacataccaacaaggtgggtaacgatcacactgttctcagccaaca  
ttgatgccatcacaagcctcagcgttgggggagagcttgtgtttaaaacaagcgtccac  
agccttgtactgggcgccaccatctaccttataggctttgatgggactgcggtaatcac  
tagagctgtagccgcaaacaatgggtgacgaccggcatcgacaatcttatgccattca  
atcttgtgattccaaccaacgagataaccagccgatcacatccatcaaactggagata  
gtgacctccaggagtgggtggtcaggcaggggatcagatgtcatggtcggcaagtgggag  
cctagcagtgacgatccatgggtggcaactatccaggggccctccgtcccgtcacactag  
tagcctacgaaagagtggcaacaggatctgtcgttacgctcgcgggggtgagcaacttc  
gagctgatcccaaactcctgaactagcaaagaacctggttacggaatacggccgatttga  
cccaggggccatgaactacacaaaattgatactgagtgatggggaccgtcttggcatca  
agaccgtctggccaacaagggtacacagactttcgtgagtacttcatggaggtggcc

01.08.21

gacctcaactctccccctgaagattgcaggagcatttggttcaaagacataatccgggc  
cataagggacgtccc

2、根据权利要求 1 所述的作物的生产方法，其特征在于：进行基因重组和重组蛋白的制备，在生产过程中将上述三种病毒的主要免疫原基因

(1)插入质粒载体：采用分子生物学的方法提抽病毒的核酸 RNA，用含启动子和终止子，针对不同病毒所设计的三对特异性引物扩增出各自相应的完整免疫原基因，片段两端为内切酶位点（Xba I 和 sal I），用相应的内切酶切表达载体和目的片段，T4 连接酶连接重组，构建各自的重组质粒；

(2) 将上述重组质粒转入植物玉米、水稻、小麦、大豆和油菜中进行表达，获得转基因植物的种子：将重组质粒转化根癌农杆菌 C58C1 菌株细胞系，于含卡那霉素的 LB 中培养，离心收集细胞，于含蔗糖和 L6-BA 的 MS 培养液中重悬，再将培养好的植物茎叶浸入含根癌农杆菌细胞的重悬液中真空浸润，用水冲洗，存放至成熟，用含 MS、蔗糖和 MES 的 GM 和卡那霉素的琼脂凝胶筛选分别单抗禽流感、新城疫或传染性法氏囊病的转基因种子，或者用重组质粒包裹金弹，采用基因轰击的方法进行转化，将分别携有单抗禽流感、新城疫或传染性法氏囊病的转基因种子培育至待授粉植株时，采用传统的杂交方法将单抗禽流感、新城疫或传染性法氏囊病的植株进行两两杂交或者三者杂交，获得同时抗禽流感、新城疫或传染性法氏囊病三种病毒病中的任意两种或者对三种疾病同时具有抵抗作用的转基因种子；



01.08.21

(3) 取种子种入土壤，获得可作为饲料原料的植物根、茎、叶、果实或种子。

## 抗家禽病毒病的作物及其生产方法

## 技术领域

本发明涉及抗家禽病毒病的作物及其生产方法，更具体地说，涉及一种抗家禽禽流感、新城疫和传染性法氏囊病三种病毒病其中的任意一种、二种或者三种的玉米、水稻、小麦、大豆、油菜作物及其生产方法。

## 背景技术

在现有技术中，用植物作表达载体来表达外源蛋白已有不少报道，但将家禽病毒抗原于植物体上表达尚未见报道。目前的预防技术中，禽流感（AI）、新城疫（ND）和传染性法氏囊病（IBD）的免疫有用死苗的，也有用弱毒苗的。但现有的免疫技术有诸多不完善因素：一是生产疫苗的厂家具有散毒的危险，二是弱毒苗具有“返祖”现象，更重要的是人为的传播了其他疾病，给病毒病的根除带来极大的困难。三是灭活苗和弱毒苗免疫的程序复杂，成本较高，免疫不确实。因此，要彻底地控制和消灭此病，必须开发一种安全、高效、低廉的替代品。研究表明：AIV 的结构蛋白 HA、NDV 的结构蛋白 F、IBDV 的结构蛋白 VP2 携有各自病毒典型的抗原决定簇，可诱发 IgA/IgG 的产生，两者均可保护试验或本体动物抵抗强毒攻击。

## 技术内容

本发明的目的在于提供一种抗家禽禽流感、新城疫和传染性法氏

01.08.21

囊病三种病毒病的其中的任意一种、二种或者三种的玉米、水稻、小麦、大豆、油菜作物及其生产方法。

为了达到上述目的，本发明提供了如下的技术方案：1、一种抗家禽禽流感、新城疫和传染性法氏囊病三种病毒病中的一种、二种或三种疾病的作物，包括玉米、水稻、小麦、大豆和油菜等，其特征在于：它们完整地表达了禽流感病毒，新城疫病毒和传染性法氏囊病毒中的任意一种、二种或三种病毒的抗原并可使家禽产生有效免疫力，用以表达的免疫原性蛋白基因为：

禽流感病毒的主要免疫原性蛋白基因即 HA 基因：

```
ttgaattcttgaattcatggaaagaacagtgccttcttcttgaacagtcagtccttgta  
aaagtgatcagatttgattggtaccatgcaaacaactcgacagagcaggttgacaca  
ataatggaaaagaatgttactgttacacatgcccaagacatactggaaaggacacacaa  
cggaagctctgcgatctaaatggagtgaagcctctcattttgagggattgtagttag  
ctggatggctcctcggaaccctatgtgtgacgaattcatcaatgtgccggaatggtct  
tacatagtgagaaggccagtcagccaatgacctctgttatccaggaatttcaacga  
ctatgaagaactgaaacacctattgagcagaataaaccattttgagaaaattcagatca  
tccccaaaagttcttgggtccaatcatgatgcctcatcaggggtgagctcagcatgtcca  
taccttgggaggtcctcctttttcagaaatgtggtatggcttatcaaaaagaacagtgc  
ataccaacaataaagaggagctacaataataccaaccaagaagatcttttgggtactgt  
ggggggttcaccatcctaataatgatgcggcagagcagacaaaagctctatcaaaatccaacc  
acctacatttccgttgaacatcaacactgaaccagagattggttccagaaatagctac  
tagacccaaagtaaacgggcaaagtgaagaatggagttcttctggacaattttaagc
```

01.08.21

cgaatgatgccatcaatttcgagagtaatggaaatttcattgctccagaatatgcatac  
aaaattgtcaagaaaggggactcaacaattatgaaaagtgaattggaatatggtaactg  
caacaccaagtggtcaaactccaatgggggcgataaactctagtagccattccacaaca  
tacacccctcaccatcggggaatgccccaaatatgtgaaatcaaacagattagtcctt  
gcgactggactcagaaatacccctcaaagagagagaagaagaaaaagagaggactatt  
tggagctatagcaggttttatagaggaggatggcaggggaatggtagatggttggtatg  
ggtaccacatagcaatgagcaggggagttgctactctgcagacaagaatccactcaa  
aaggcaatagatggagtcaccaataaggtcaactcgatcattaacaaaatgaacactca  
gtttgaggccgttggaaaggaatttaataaacttggaaggaggatagagaatttaaaca  
agaagatggaagacggattcctagatgtctggacttacaatgctgaacttctggttctc  
atggaaaatgagagaactctcgactttcatgactcaaatgtcaagaacctttacgacaa  
ggtccgactacagcttagggataatgcaaaggagctgggtaatggttgtttcgaattct  
atcacaaatgtgataatgaatgtatggaaagtgtaaaaaacggaacgtatgactacccg  
cagtattcagaagaagcaagactaaacagagaggaaataagtggagtaaaattggaatc  
aatgggaacttaccaaatactgtcaatttattcaacagtggcgagttccctagcactgg  
caatcatggtagctggtctatctttatggatgtgctccaatggatcgttacaatgcaga  
atttgcatttaaatttgtgagttcagattgtagttaaaaacaccctgacgtcgagacgt  
acc

新城疫病毒的主要免疫原性蛋白基因即 F 基因：

ttgaattcatgggccccaaattcttaccaatgtcccagcacctctgatgctgaccgtcaggattgcgctg  
gcactgagctgtgtccgtcgacaaattctctcgatggaaggcctcttgacgtgcagggattgtagtaac  
gggagacaaagcagtcacatatcacctcatctcagacagggtcaataatagtcagttactcccaaat

01.08.21

atgcctaaggataaagaggcgtgtgcaaaagccccgttggaggcatacaacaggacactgactgctttg  
ctcacccttgggtgattctatccgcaggatacaagagtctgcgactacgtccggaggaaggaggcag  
agacgctttataggtgccattatcggcagtgtagctcttgggggtgccacagctcccagataacagcag  
cctcagctctgatacaagccaaccagaatgctgccaacatcctccggctaaagagagcattgctgcaac  
taatgaagctgtacatgaagtcactgacggattatcgcaactagcagtggcagttgggaagatgcagca  
gtttgttaatgaccagtttaaacacagctcaggaattggactgtataaaaattacacagcaggttggtga  
gaactcaacctgtacctaactgaattgactacagtattcgggccacaaatcactcccctgccttaactcag  
ctgactatccaggcgctttacaatctagctgggtgtaagatggattattgttgactaagttaggtgttgga  
acaaccaactcagctcattaatcggtagcggctgatcaccgtaaccctattctgtacgattcacagactc  
aactcttaggtatacaggttaactttaccctcagtcggtaacctaaataatgcgtgctacctacttgagac  
cttgtctgtaagcacaaccaagggatttgcctcagcactgtcccaaaagtggtagacacaggtcgggtct  
gtgatagaggaacttgacacctatactgtgtagagaccgatttggatttatattgtacaagaatagtga  
ttccctatgtctcctgggtatttctgtctgagcggtaatacatcagcttgcattgattcaagactgaaggt  
gcacttactacgccatatatgactatcaagggtcagttattgccaattgcaagataacaacatgcagatgt  
gcagaccctccgggtatcatatcgaaaattatggagaagctgtgtctctaatagataggcactcatgcaa  
tgtcttacccttagacgggataactttgaggctcagtgagaaatttgacgtaacttatcaaaagaatatctca  
atattagattctcaggtaatgtgacaggcaatctcaatatctcaactgaacttggaatgtcaacaactcg  
ataagtaatgcttggataagttagaggaaagcaatagcaaaacttgacaaagtcaatgtcaagctgaccg  
gcacgtctgctctcattacctatatagttttaactatcatatcttgtttgtgtatacttagcctggtctagca  
tgctatctgatgtataagcaaaaggcgcaaaaaagaccttattatggcttgggaataataccctaaatca  
gatgagggccactacaagaatctgaacacagagacgtccc

法氏囊病毒的主要免疫原性蛋白基因即 VP2 基因：

01.08.21

ttgaattcatgacaaacctgcaagatcaaaccacagattgttcggttcatacggagc  
cttctgatgccacaaccggaccggcgctccattccggacgacaccctggagaagcacac  
tctcaggtcagagacctcgacctacaatttgactgtgggggacacagggtcagggctaa  
ttgcctttttccctggattccctggctcaattgtgggtgctcactacacactgcagagc  
aatgggaactacaagttcgatcagatgctcctgactgcccagaacctaccggccagcta  
caactactgcaggctagttagccggagtctcacagtaaggtcaagcacactccctgggtg  
gcgtttatgcactaaacggcaccataaacgccgtgaccttccaaggaagcctgagtga  
ctgacagatgttagctacaatggattgatgtctgcaacagccaacatcaacgacaaaat  
tgggaacgtccttagtaggggaaggggtcacgcctcagcttaccacatcatatgatc  
ttgggtatgtgagacttggtgaccccataccgcctatagggttgacccaaaaatggta  
gcaacatgtgacagcagtgacaggcccagagtctacactataactgcagccgatgatta  
ccaattctcatcacaaataccaacaaggtggggtaacgatcacactgttctcagccaaca  
ttgatgccatcacaagcctcagcgttgggggagagcttggtttaaaacaagcgtccac  
agccttgactgggcgccaccatctaccttataggctttgatgggactgcggtaatcac  
tagagctgtagccgcaaacaatgggctgacgaccggcatcgacaatcttatgccattca  
atcttgatgattccaaccaacgagataaccagccgatcacatccatcaaactggagata  
gtgacctccaggagtgggtggtcaggcaggggatcagatgtcatggtcggcaagtgggag  
cctagcagtgacgatccatggtggcaactatccaggggccctccgtcccgtcacactag  
tagcctacgaaagagtggcaacaggatctgtcggttacgctcgccggggtgagcaacttc  
gagctgatcccaaactctgaactagcaaagaacctgggttacggaatacggccgatttga  
cccaggggccatgaactacacaaaattgatactgagtgatggggaccgtcttgccatca  
agaccgtctggccaacaagggtgacacagactttcgtgagtacttcatggaggtggcc

01.08.21

gacctcaactctcccctgaagattgcaggagcatttggttcaaagacataatccgggc  
cataagggacgtccc

上述三序列通过植物反应器表达出各自的重组蛋白，并形成三级结构。

本发明较好的技术方案是：实施过程中，进行基因重组和重组蛋白的制备，在生产过程中将上述三种病毒的主要免疫原基因（1）插入质粒载体：采用分子生物学的方法提抽病毒的核酸 RNA，用含启动子和终止子，针对不同病毒所设计的三对特异性引物扩增出各自相应的完整免疫原基因，片段两端为内切酶位点（Xba I 和 sal I），用相应的内切酶切表达载体和目的片段，T4 连接酶连接重组，构建各自的重组质粒；（2）将上述重组质粒转入植物玉米、水稻、小麦、大豆和油菜中进行表达，获得转基因植物的种子：将重组质粒转化根癌农杆菌 C58C1 菌株细胞系，于含卡那霉素的 LB 中培养，离心收集细胞，于含蔗糖和 L6-BA 的 MS 培养液中重悬，再将培养好的植物茎叶浸入含根癌农杆菌细胞的重悬液中真空浸润，用水冲洗，存放至成熟，用含 MS、蔗糖和 MES 的 GM 和卡那霉素的琼脂凝胶筛选转基因种子；或者用重组质粒包裹金弹，采用基因轰击的方法进行转化，获得分别单抗禽流感、新城疫或传染性法氏囊病的转基因种子。将分别携有单抗禽流感、新城疫或传染性法氏囊病的转基因种子培育至待授粉植株时，采用传统的杂交方法将单抗禽流感、新城疫或传染性法氏囊病的植株进行两两杂交或者三者杂交，获得同时抗禽流感、新城疫或传染性法氏囊病三种病毒病中的任意两种或者对三种疾病同时具有抵抗

作用的转基因种子；(3) 取种子种入土壤，获得可作为饲料原料的植物根、茎、叶、果实或种子。

在实施本发明的过程中，将三种病毒（禽流感病毒，新城疫病毒、传染性法氏囊病毒）分别置 9 日龄鸡胚繁殖一代后，从尿囊液中提取各个病毒的 RNA，RT-PCR 扩增出各自的完整免疫原蛋白基因。

上述三序列通过植物反应器表达出各自的重组蛋白，并形成三级结构，用含重组活性蛋白的作物作饲料，给家禽进食两周以后，可起到预防三种疾病其中的任意一种、或其中的任意二种或者三种疾病的作用。

在实施本发明的过程中，抗家禽疾病的作物的生产包括用特异的引物获得各个目的基因、基因重组、重组质粒转化植物，免疫方法包括用含重组蛋白的作物制作饲料并饲喂家禽。病毒的 RNA 从接种鸡胚或鸡体组织中抽提，用反转录一聚合酶链式反应扩增基因，在引物中导入了内切酶位点（Xba I 和 Sal I）和起始子及终止子，将各个病毒的主要免疫原基因克隆至表达载体中，将重组的质粒转入植物中进行表达，待转基因植物种子成熟后获得分别单抗禽流感、新城疫或传染性法氏囊病的转基因种子。或者用重组质粒包裹金弹，采用基因轰击的方法进行转化，获得分别单抗禽流感、新城疫或传染性法氏囊病的转基因种子。将分别携有单抗禽流感、新城疫或传染性法氏囊病的转基因种子培育至待授粉植株时，采用传统的杂交方法将单抗禽流感、新城疫或传染性法氏囊病的植株进行两两杂交或者三者杂交，获得同时抗禽流感、新城疫或传染性法氏囊病三种病毒病中的任意两种



或者对三种疾病同时具有抵抗作用的转基因种子。后将抗各种病毒的种子播种,成熟后用作家禽饲料原料。用作转基因的植物可以是玉米、水稻、大豆、小麦、油菜等。转基因植物经过培育后,其根、茎、叶、果实或种子中含有三各种病毒其中的任意一种病毒、或其中的任意二种病毒或者三种病毒同时含有的外源免疫原性蛋白,并可经 ELISA 法和 Western blot 法检测确证。

实施过程中,将植物种子种于小杯中,在 4℃暗室中放置 48 小时使其同步发芽。后转至生长室 20℃曝光 16 小时,用双蒸水,偶而用矿物质水浇灌。重组质粒转化根癌农杆菌细胞系(Agrobacterium tumefaciens cell line)(C58C1 株),在 LB (Luri-Bertani) 培养液中(含卡那霉素 50mg/ml)培养离心收集细胞,于 200ml MS (murashige 和 Skoog) 培养液(2.35g/l)(含 5%蔗糖和 10g/L 的 6-BA (6-苄氨基嘌呤 6-benzilaminopurine 中重悬。待植物 6-7 周龄时,倒置培养杯将植物浸入含根癌农杆菌细胞(Agrobacterium)的重悬液中,真空  $5 \times 10^6$  mp。浸润渗透 15 分钟,用水冲洗后放于生长室中直至成熟。在培养皿中用含 GM (4.7g/lMS、1%蔗糖和 0.5g/LMES (吗啉乙烷磺酸: morpholine ethane sulfonic acid) 和 50mg/ml 卡那霉素的琼脂凝胶(8g/lPH5.7)中筛选转基因种子。两周后,将转基因植物移至土壤中培育成熟即可分别单抗禽流感、新城疫或传染性法氏囊病的转基因种子。或者用重组质粒包裹金弹,采用基因轰击的方法进行转化,经过培育和 Southern blot 检测确认后获得分别单抗禽流感、新城疫或传染性法氏囊病的转基因种子。

将分别携有单抗禽流感、新城疫或传染性法氏囊病的转基因种子培育至待授粉植株时，采用传统的杂交方法将单抗禽流感、新城疫或传染性法氏囊病的植株进行两两杂交或者三者杂交，获得同时抗禽流感、新城疫或传染性法氏囊病三种病毒病中的任意两种或者对三种疾病同时具有抵抗作用的转基因种子。

转基因植物的根、茎、叶、果实和种子中含有三个病毒其中的任意一种病毒、或其中的任意二种病毒或者三种病毒同时含有的相应的外源基因，经 PCR 检测确证，所含外源蛋白可经 ELISA 和 Western blot 检测确证。

与现有技术相比，本发明具有以下明显的优点：一是生产技术简单，二是作物中的重组蛋白具有免疫原性，可诱发家禽产生抗体抵抗家禽禽流感、新城疫和传染性法氏囊病病毒的其中的任意一种疾病、或其中的任意二种疾病或者对三种疾病同时具有抵抗作用，家禽进食含上述作物的饲料两周后，用  $10^4$  ID<sub>50</sub> 相应病毒攻毒，免疫小鸡的保护率为 100%，而对照组则全部死亡，因而技术效果好。

#### 实施方式

以下通过具体的实施例对本发明进行更加详细的描述：

##### 实施例 1

##### 抗禽流感作物

用小鸡或鸡胚繁殖禽流感病毒，采用分子生物学方法抽提病毒的核酸 RNA，用含启动子和终止子的特定引物扩增出 HA 的完整基因，片段两端含有内切酶位点 Xba I 和 Sal I，用相应的内切酶酶切表达

## 01.08.21

载体和目的片段, T4 连接酶连接重组, 构建重组质粒, 将各个重组质粒转化根癌农杆菌细胞系 (C58C1 株), 于 LB 培养液 (含卡那霉素 50mg/ml) 培养, 离心收集细胞, 于 200mlMS 培养液 (2.35g/l 浓度) (含 5%蔗糖和 10g/l6-BA) 中重悬。

将植物的种子植入小杯中, 于 4℃暗室中放置 48 小时使其同步发芽, 其后转移至生长室 20℃曝光 16 小时, 用双蒸水, 偶尔用矿物质水浇灌。待植物 6-7 周龄时, 倒置培养杯将植物茎叶浸入含根癌农杆菌细胞的重悬液中, 真空度  $5 \times 10^6$  mp. 浸润渗透 15 分钟, 用水冲洗后放入生长室中直至成熟。在培养皿中, 用含 GM (4.7g/lMS、1%蔗糖和 0.5g/lMES) 和 50mg/ml 浓度卡那霉素的琼脂胶凝 (8g/lPH5.7) 中筛选转基因植株。两周后, 将转基因植物移至土壤中培养成熟即可获得抗禽流感的转基因种子。或者用重组质粒包裹金弹, 采用基因轰击的方法进行转化, 经过培育和 Southern blot 检测确认后获得抗禽流感的转基因种子。

各个转基因植物的根、茎、叶、果实或种子中所含禽流感的外源基因 HA, 可经其的 PCR 检测引物检测存在。

各个转基因植物的根、茎、叶、果实或种子中所含的外源蛋白 HA, 经 ELISA 和 Western blot 检测其存在, 阳性对照为空质粒转化的植物抽提物中混有人工合成的位于 HA 蛋白中的一些抗原决定簇的多肽 (10ug/ml), 阴性对照为空质粒转化的植物抽提物。结果显示转基因植物的根、茎、叶、果实或种子中含有外源蛋白 HA, 能够与蛋白中相应的抗原多肽血清发生明显的反应。在 Western blot 检测中,

用抗 HA 的血清可检测到特异性的条带, 分子量为 30-150KD, 得出与 ELISA 相同的检测结果。

用 ELISA 和 Western blot 检测各个抗禽流感的转基因植物免疫小鸡后血清中抗 AIV 的相应抗体的存在, ELISA 检测结果显示: 小鸡血清中含有抗禽流感病毒抗体, 具有特异性的抗相应多肽和 AIV 的特性; Western blot 检测结果显示: 用相应重组质粒转染的转基因植物的抽提物免疫小鸡获得的混合血清, 同相应的抗多肽血清一样具有特异性的反应带。家禽进食含上述作物的饲料两周后, 用  $10^4$  ID<sub>50</sub> 相应的禽流感病毒攻毒, 免疫小鸡的保护率为 100%, 而对照组则全部死亡。

## 实施例 2

### 抗新城疫作物

用小鸡或鸡胚繁殖新城疫病毒, 采用分子生物学方法抽提病毒的核酸 RNA, 用含启动子和终止子的特定引物扩增出 F 的完整基因, 片段两端含有内切酶位点 Xba I 和 Sal I, 用相应的内切酶酶切表达载体和目的片段, T4 连接酶连接重组, 构建重组质粒, 将重组质粒转化根癌农杆菌细胞系 (C58C1 株), 于 LB 培养液 (含卡那霉素 50mg/ml) 培养, 离心收集细胞, 于 200ml MS 培养液 (2.35g/l 浓度) (含 5% 蔗糖和 10g/l 6-BA) 中重悬。

将植物的种子植入小杯中, 于 4℃ 暗室中放置 48 小时使其同步发芽, 其后转移至生长室 20℃ 曝光 16 小时, 用双蒸水, 偶尔用矿物质水浇灌。待植物 6-7 周龄时, 倒置培养杯将植物茎叶浸入含根癌农

杆菌细胞的重悬液中，真空度  $5 \times 10^6 \text{mp}$ 。浸润渗透 15 分钟，用水冲洗后放入生长室中直至成熟。在培养皿中，用含 GM (4.7g/lMS、1%蔗糖和 0.5g/lMES) 和 50mg/ml 浓度卡那霉素的琼脂胶凝 (8g/lPH5.7) 中筛选转基因植株。两周后，将转基因植物移至土壤中培养成熟即可获得抗新城疫的转基因种子。或者用重组质粒包裹金弹，采用基因轰击的方法进行转化，经过培育和 Southern blot 检测确认后获得抗新城疫的转基因种子。

各个转基因植物的根、茎、叶、果实或种子中所的外源基因 F，可经 PCR 检测引物检测存在。

各个转基因植物的根、茎、叶、果实或种子中所含的外源蛋白 F，经 ELISA 和 Western blot 检测其存在，阳性对照为空质粒转化的植物抽提物中混有人工合成的位于 F 蛋白中的一些抗原决定簇的多肽 (10ug/ml)，阴性对照为空质粒转化的植物抽提物。结果显示转基因植物的根、茎、叶、果实或种子中含有外源蛋白，能够与 F 蛋白中相应的抗原多肽血清发生明显的反应。在 Western blot 检测中，用抗 F 的血清可检测到特异性的条带，分子量为 30-150KD。得出与 ELISA 相同的检测结果。

用 ELISA 和 Western blot 检测各个转基因植物免疫小鸡后血清中抗 NDV 的相应抗体的存在，ELISA 检测结果显示：小鸡血清中含有抗新城疫病毒的抗体，具有特异性的抗相应多肽和 NDV 的特性；Western blot 检测结果显示：用重组质粒转染的转基因植物的抽提物免疫小鸡获得的混合血清，同相应的抗多肽血清一样具有特异性的

反应带。家禽进食含上述作物的饲料两周后，用 $10^4$  ID<sub>50</sub>新城疫病毒攻毒，免疫小鸡的保护率为100%，而对照组则全部死亡。

### 实施例 3

#### 抗传染性法氏囊病作物

用小鸡或鸡胚繁殖传染性法氏囊病病毒，采用分子生物学方法抽提病毒的核酸 RNA，用含启动子和终止子的特定引物扩增出 VP2 的完整基因，片段两端含有内切酶位点 Xba I 和 Sal I，用相应的内切酶酶切表达载体和目的片段，T4 连接酶连接重组，构建重组质粒，将重组质粒转化根癌农杆菌细胞系 (C58C1 株)，于 LB 培养液 (含卡那霉素 50mg/ml) 培养，离心收集细胞，于 200mlMS 培养液 (2.35g/l 浓度) (含 5%蔗糖和 10g/l6-BA) 中重悬。

将植物的种子植入小杯中，于 4℃暗室中放置 48 小时使其同步发芽，其后转移至生长室 20℃曝光 16 小时，用双蒸水，偶尔用矿物质水浇灌。待植物 6-7 周龄时，倒置培养杯将植物茎叶浸入含根癌农杆菌细胞的重悬液中，真空度  $5 \times 10^5$  mp。浸润渗透 15 分钟，用水冲洗后放入生长室中直至成熟。在培养皿中，用含 GM (4.7g/lMS、1%蔗糖和 0.5g/lMES) 和 50mg/ml 浓度卡那霉素的琼脂胶凝 (8g/lPH5.7) 中筛选转基因植株。两周后，将转基因植物移至土壤中培养成熟即可获得抗传染性法氏囊病病毒的转基因种子。或者用重组质粒包裹金弹，采用基因轰击的方法进行转化，经过培育和 Southern blot 检测确认后获得抗传染性法氏囊病的转基因种子。

各个转基因植物的根、茎、叶、果实或种子中所含相应的外源基

因 VP2, 可经的 PCR 检测引物检测存在。

各个转基因植物的根、茎、叶、果实或种子中所含的外源蛋白 VP2, 经 ELISA 和 Western blot 检测其存在, 阳性对照为空质粒转化的植物抽提物中混有人工合成的位于 VP2 中的一些抗原决定簇的多肽 (10ug/ml), 阴性对照为空质粒转化的植物抽提物。结果显示转基因植物的根、茎、叶、果实或种子中含有外源蛋白, 能够与 VP2 蛋白中相应的抗原多肽血清发生明显的反应。在 Western blot 检测中, 用抗 VP2 的血清可检测到特异性的条带, 分子量为 30-150KD, 得出与 ELISA 相同的检测结果。

用 ELISA 和 Western blot 检测转基因植物免疫小鸡后血清中抗 IBDV 的相应抗体的存在, ELISA 检测结果显示: 小鸡血清中含有抗 IBDV 的抗体, 具有特异性的抗相应多肽和 IBDV 的特性; Western blot 检测结果显示: 用相应重组质粒转染的转基因植物的抽提物免疫小鸡获得的混合血清, 同相应的抗多肽血清一样具有特异性的反应带。家禽进食含上述作物的饲料两周后, 用  $10^4$  ID<sub>50</sub> IBDV 攻毒, 免疫小鸡的保护率为 100%, 而对照组则全部死亡。

#### 实施例 4

抗禽流感、新城疫和传染性法氏囊病三种病毒中任意二种或者同时抗三种病毒疾病的作物

将上述分别携有单抗禽流感、新城疫或传染性法氏囊病的转基因种子培育至待授粉植株时, 采用传统的杂交方法将单抗禽流感、新城疫或传染性法氏囊病的植株进行两两杂交或者三者杂交, 获得同时抗

禽流感、新城疫或传染性法氏囊病三种病毒病中的任意两种或者对三种疾病同时具有抵抗作用的转基因种子。

各个转基因植物的根、茎、叶、果实或种子中所含相应的外源基因，均可经相应的 PCR 检测引物检测存在。

各个转基因植物的根、茎、叶、果实或种子中所含的外源蛋白 HA、F 和 VP2，经 ELISA 和 Western blot 检测其存在，阳性对照为空质粒转化的植物抽提物中混有人工合成的位于 HA、F 和 VP2 中的一些抗原决定簇的多肽(10ug/ml)，阴性对照为空质粒转化的植物抽提物。结果显示转基因植物的根、茎、叶、果实或种子中含有外源蛋白，能够与 HA、F 和 VP2 蛋白中相应的抗原多肽血清发生明显的反应。在 Western blot 检测中，用抗 HA、F 和 VP2 的血清可检测到特异性的条带，分子量为 30-150KD。得出与 ELISA 相同的检测结果。

用 ELISA 和 Western blot 检测转基因植物免疫小鸡后血清中抗 AIV、NDV 和 IBDV 的相应抗体的存在，ELISA 检测结果显示：小鸡血清中含有抗 AIV、NDV 和 IBDV 的抗体，具有特异性的抗相应多肽和 AIV、NDV 和 IBDV 的特性；Western blot 检测结果显示：用相应重组质粒转染的转基因植物的抽提物免疫小鸡获得的混合血清，同相应的抗多肽血清一样具有特异性的反应带。家禽进食含上述作物的饲料两周后，用  $10^4$  ID<sub>50</sub> 相应的病毒攻毒，免疫小鸡的保护率为 100%，而对照组则全部死亡。